动 物 学 研 究 2003, Aug. 24 (4): 311~317
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

流式细胞术在哺乳动物精液质量检测中的应用

采克俊[1,2], 司　维[1,2], 李亚辉[1,2,3], 季维智[1,4]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 云南农业大学食品科学与技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 精液检测的首要目标就是快速准确地确定精子的生育力。同时具备多种特性和功能完整的精子才能受精, 因而只有同时客观地检测多个指标, 才能更好地反映精子的生育力。精子检测的传统方法费时费力, 检测精子数量少, 指标单一, 而且易受操作者的主观影响, 不能准确地反映精子功能。流式细胞术 (FCM) 为精子功能研究提供了一种快速、客观、多指标、大通量的检测手段; 利用 FCM 检测精子的质膜完整性、顶体状态、染色质结构、线粒体功能以及细胞凋亡等, 可以得知精子功能的相关情况。随着新的荧光探针、染色方法的不断开发和改进, FCM 为精液质量检测提供了一种新的检测平台, 应用前景极其广阔。

关键词: 流式细胞术; 精子; 检测; 荧光探针
中图分类号: Q492; Q955　**文献标识码**: A　**文章编号**: 0254-5853(2003)04-0311-07

Evaluation of Mammalian Semen Quality by Flow Cytometry

CAI Ke-jun[1,2], SI Wei[1,2], LI Ya-hui[1,2,3], JI Wei-zhi[1,4]
(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*;
2. *Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*;
3. *College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming* 650201, *China*)

Abstract: The primary goal of all semen analyses is to accurately determine the fertilizing potential of semen samples rapidly. Since a spermatozoon must possess many attributes in order to fertilize an oocyte, the only way that we can more precisely predict the fertility is to develop unbiased assays that measure several sperm traits simultaneously. Conventional laboratory assays of spermatozoa, using subjective method, many are time consuming, and are necessarily conducted on samples of relatively small size, fall short of predicting the sperm function. Flow cytometry (FCM) permits us to objectively measure thousands of sperm for multiple characteristics in a short time with minimum preparation. The applications of FCM to evaluation of semen quality including sperm plasma membrane integrity, acrosome status, chromatin structure, mitochondrial activity as well as apoptosis etc, provide us valuable information regarding sperm function. FCM offers powerful tools and exciting opportunities for improving our ability to accurately evaluate semen quality with new fluorescent probes and techniques continuously being developed.

Key words: Flow cytometry; Spermatozoa; Evaluation; Fluorescent probes

精液质量检测在临床治疗不孕症及家畜良种繁殖和育种中具有重要作用。常规的精液检查 (精子密度、运动性、形态等) 重复性差, 提供的精子功能的信息非常有限, 不能为生育力提供准确评估的依据。其他方法 (包括精子染色的显微镜检测、精子-颈粘液相互作用检查、精子穿透去透明带仓鼠卵实验、低渗肿胀实验以及超微结构检查等) 虽然可以提供精子功能方面的一些信息, 但费时费力; 检测精子数量少; 指标单一; 且易受操作者的主观影响, 不能准确反映精子的功能。近年来, 随着生殖生物学的发展和人类对辅助生殖技术的迫切需求, 基于精子形态学观察为主的传统检测方法已不能满足人们的需要, 因而寻找一种快速、准确的精液质量检测方法显得十分迫切。

收稿日期: 2002-10-25; 接受日期: 2003-01-06
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970117); 中国科学院重大项目 (KZ952-J1-109)
4. 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0871-5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

流式细胞术（flow cytometry，FCM）是20世纪70年代发展起来的一种单细胞快速分析技术，已广泛应用于细胞生物学和医学的各个领域。流式细胞术的基本原理是：特异荧光探针标记的单细胞悬液在管道中稳定地流动，细胞一个个依次经过喷嘴，经恒定功率的激光束激发后产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被0°方向的光电二极管和90°方向的光电倍增管接收，经计算机处理，细胞的一系列特性就被快速准确地测定。在此基础上还可以根据有关参数把所需细胞亚群从整个样品中分选出来。

FCM在哺乳动物精子研究中发挥着重要作用：通过分析生精细胞的增殖周期研究精子发生；还可根据X、Y精子DNA含量的差异进行精子性别鉴定，即精子分选；检测精液质量。流式细胞术为精子功能实验提供了快速、客观、多指标、大通量的检测手段，弥补了传统方法的缺陷，成为一种检测精液质量的新平台。随着新的荧光探针和染色方法的不断开发和改进，这一新的检测技术在近20年来应用越来越广泛，也必将在人类辅助生殖技术、畜牧业冻精商业化运作以及珍稀濒危物种的精子冻存研究中展现更加广阔的应用前景。本文就流式细胞术近年来在检测精子的质膜完整性、顶体状态、染色质结构完整性、线粒体功能、细胞凋亡等方面的应用作一简要综述，并对其应用前景作一展望。

1 测定精子的质膜完整性

精子的质膜完整性又可称为精子的活力（viability），是检测精液质量的重要指标之一，也是FCM应用最多的领域。检测精子活力的探针主要有两类：①对死精子特异的荧光染料有碘化丙锭（propidium iodide，PI）、Hoechst 33258、溴化乙锭（ethidium bromide，EB）、溴乙啡锭二聚体（ethidium homodimer-1，EthD-1）和Yo-Pro-1等，其中PI最为常用。它们是膜不透性的DNA探针，只有质膜破损的精子，染料才能进入细胞与DNA结合。②对活精子特异的荧光染料有SYBR-14、羧基荧光素双醋酸盐（carboxy fluorescein diacetate，CFDA）、羧基二甲基荧光素双醋酸盐（carboxy dimethyl fluorescein diacetate，CMFDA）、Carboxy-SNARF-1和SYTO-17等。它们是膜通透性的染料，能进入细胞膜完整的精子。其中，Carboxy-SNARF-1是一种胞内pH指示剂，在活精子内发橙红色荧光（Pena et al，1999）；SYTO-17标记活精子的细胞核，发红色荧光（Thomas et al，1997）；CFDA和CMFDA是一种非荧光化合物，在活细胞胞内被非特异酯酶水解，形成一种很强的荧光染料，发绿色荧光（Pena et al，1998；Ericsson et al，1989）。

这两类染料经常联合使用。对死精子特异的荧光染料虽然可以单独使用，但效果不如联用好。SYBR-14和PI联合使用，可以很好地检测精子活力（Garner et al，1994；Garner & Johnson，1995）。其原理可能是PI进入死精子头部后端，取代了SYBR-14或使SYBR-14的荧光猝灭。样品经流式细胞仪检测可得3种亚群：①被SYBR-14染成绿色的活精子，并且比死精子亮得多；②被PI染成红色的死精子；③同时染上并发出两种荧光的双阳性精子，正处于从活向死的过渡状态。这种方法已用于检测许多物种的精子活力。CFDA、CMFDA、SYTO-17等分别与PI联合染色，通过流式细胞仪检测也可得到类似的3类精子。Carboxy-SNARF-1也可以和PI联合使用，Carboxy-SNARF-1发橙红色荧光，但其荧光值大大低于PI的荧光值，用同一个探测器也能把两者区别开（Pena et al，1999）。这一组合的优点是可以和发绿色荧光的顶体探针结合。否则只用PI测活力，活精子和颗粒较大的杂质（如蛋黄颗粒）都不能被PI标记，也就不能把两者区分开。

与上述两类染料不同，Hoechst 33342是一种膜通透性活体染料，能标记死精子和活精子，而PI只标记死精子。本研究室发展了一种仅用紫外激光就同时激发这两种探针来检测精子活力的方法：活精子只被Hoechst 33342标记，发蓝色荧光；死精子为PI阳性，同时也被Hoechst 33342标记，故死精子为粉红色。这一染色方法适用于流式和荧光显微镜检测，且可以和发绿色或黄色荧光的其他探针合用，同时检测多个指标。该方法已成功地用于牛、猕猴、食蟹猴、大鼠、小鼠精子活力的检测（资料待发表）。一般认为，在精子活力检测的所有方法中，SYBR-14与PI的联合使用效果最佳。该组合染色时间短，对温度要求不严格，且都是核染料。而其他组合染色时间长，标记的细胞器不同，易出现误差。

2 检测精子顶体状态

在受精过程中，哺乳动物刚射出的精子在体内

要经过获能和顶体反应，才能穿入卵细胞并与其融合，完成受精。因此检测精子的顶体状态，有助于反映精子的受精能力。金霉素（chlortetracycline，CTC）顶体染色法，是荧光显微镜检测的常用方法，可客观而定量地评价精子获能、顶体反应（DasGupta et al，1993）。但这种染料在FCM检测时不能很好地将获能与未获能的精子分开，而且样品要固定，所以CTC染色法不适用于FCM（Rathi et al，2001）。精子在获能和顶体反应过程中，精子膜外源凝集素受体会发生变化。因此可以利用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的凝集素检测精子的顶体状态。已经有多种凝集素被用于精子顶体状态检测，如花生凝集素（PNA）、豌豆凝集素（PSA）、刀豆凝集素（ConA）和植物血凝素（RCA）等。其中PNA和PSA较常用，PNA效果最好。经电子显微镜观察证实，PNA能特异结合顶体外膜（Szasz et al，2000）。FITC-PNA检测顶体反应有两种样品处理方法：①样品需要固定，FITC-PNA才能穿过质膜和顶体外膜，标记顶体。顶体完整的精子可结合更多的FITC-PNA，故FITC-PNA荧光值变得更高；而顶体反应后，顶体丢失，FITC-PNA的荧光值降低（Purvis et al，1990）。死亡降解的精子也会出现顶体丢失，但只有活精子的顶体丢失才能称为真正的顶体反应。因而检测顶体反应必须同时检测精子的活力。Tao et al（1993a）先用Hoechst 33258标记，之后加入一定量鲑鱼精子DNA（SS-DNA）结合多余的染料，洗涤后再固定，再用FITC-PNA标记，Hoechst 33258阴性、PNA阳性者为顶体反应的精子。尽管这种方法可以同时测得精子活力和顶体状态，但该方法较烦琐。②不经固定，直接用精子活力染料PI（或Hoechst 33258、EthD-1）和FITC-PNA标记。其结果PI^+为死精子；PI^-/PNA^+为顶体反应精子；PI^-/PNA^-为顶体完整的活精子（Graham et al，1990；Szasz et al，2000）。凝集素对精子有一定毒性，染色时间不宜过长。

此外，荧光素标记的顶体特异性单克隆抗体结合Hoechst 33258的双标记也能检测顶体反应（Tao et al，1993b）。完整顶体的活精子呈酸性，可被嗜酸性探针LysoTracker特异标记，呈绿色荧光。经证明，LysoTracker阳性率与显微镜观察到的正常顶体的百分率相吻合（Thomas et al，1997）。

Ca^{2+}内流是精子获能的一种表现形式，因此可用钙离子探针（如fluo-3和indo-1等）检测Ca^{2+}的浓度变化（Harrison et al，1993）。质膜不稳定性加剧也是精子获能的另一种表现形式，因而也可用疏水性染料与膜不透性探针反映精子获能。精子获能后细胞膜流动性增大，染色强，染料分布在质膜的外层。常用部花青540（merocyanine 540，发射光峰值为570～590 nm）与Yo-Pro-1（发射光峰值509 nm）双标记可检测到死精子、未获能活精子和获能活精子（Harrison et al，1996）。

3 检测精子染色质结构完整性

精子染色质结构完整性对于精确传递遗传物质至关重要。精子核高度致密，其DNA与鱼精蛋白紧密结合，这样可以将父方遗传信息准确无误地导入卵，继而传给后代。检测精子染色质结构完整性有PI染色和吖啶橙（acridine orange，AO）染色两种方法。Pasteur et al（1991；1994）在研究人鲜精和冻精的PI染色特性时发现，DNA直方图上有一主峰，该主峰右侧还延伸出一小峰，小峰代表的是核凝聚度降低的精子，其染色质结构不稳定，DNA可染性增强；冻精的主峰及小峰荧光值显著高于鲜精，说明冷冻使精子染色质凝聚度降低，可染性增强。异常精子DNA直方图主峰加宽，右移，出现小的附加峰，DNA荧光值与精子正常形态百分率呈显著负相关（Huang & Pan，1998）。目前用PI染色来检测精子染色质结构完整性报道的还较少，实验方法还不统一，提供的信息也较少，故应用并不广泛。

广为使用的权威方法是精子染色质结构分析（sperm chromatin structure assay，SCSA）。通过热处理，来自低生育力的牛、小鼠和人精子的染色质更容易变性（Evenson et al，1980）；采用酸变性处理对人和动物精液的研究得到相同的结论（Evenson et al，1999，2000；Bochenek et al，2001）。也就是染色质异常的精子易受热或酸变性成单链DNA，与染料吖啶橙结合发红色荧光；而染色质正常的精子能保持完整DNA双链结构，与吖啶橙结合发绿色荧光。因而根据这一特性，样品经热或酸变性处理后，若红光值比例增高，则说明染色质结构异常增加。通过专用软件进行数据处理，SCSA可检测下列参数：αt（指红色荧光与总荧光的比值，即αt＝红/红＋绿）；COMPαt（cells outside the main population，指主群以外的精子占总数的比例）；SDαt（the standard diviation of alpha t，指αt的标准差）；

HIGRN（high green stainability，指绿色荧光可染性增加的精子所占百分数）。SCSA 主要用于以下方面。

3.1 评估精子生育力

Evenson et al（1999）提出 COMPαt 是预测妊娠成败的最佳指标，COMPαt≥30%可作为评估精子的生育力高低的域值，大于该值的实验组无妊娠成功者。Larson et al（2000）对 SCSA 在体外受精（IVF）和胞质内单精注射（ICSI）妊娠结果的预测效果进行了研究，发现 7 例妊娠成功者与 14 例妊娠失败者相比，其精子的 COMPαt 值差异显著[(15.4±4.6)%与（31.1±3.2)%，$P=0.01$]；认为如果精子的 COMPαt≥27%，妊娠不能成功。

3.2 评价各种体外处理技术对精子染色质结构完整性的影响

精液的体外处理是否会影响精子 DNA 完整性是需要慎重考虑的问题。Zini et al（1999；2000）发现，Percoll 密度梯度离心处理后，不育组精液 DNA 变性率（COMPαt）明显升高，正常组无显著变化；而上游法可明显改善回收精子的 DNA 完整性。梯度离心法虽然在精子活动率以及正常形态方面优于玻璃纤维过滤法，后者却能提高精子 DNA 完整性（SDαt）和活力（Larson et al，1999）。这要求重新检查目前常用的精液体外处理技术，避免造成对精子染色质结构完整性的破坏。

3.3 评估癌症治疗以及各种外源因素对精子发生的影响

Kobayashi et al（2001）发现绝大多数癌症患者精子的 DNA 损伤普遍存在，αt、COMPαt 值显著高于正常对照组。术前染色质结构正常的睾丸癌患者，比异常者更易恢复精子发生（Fossa et al，1997）。小鼠睾丸若暴露于高于正常生理温度的环境中，会损伤精子染色质结构完整性，这一指标比精子头部形态检测更灵敏（Sailer et al，1997）。Bonde et al（2002）对带铅环境下作业的工人检测发现，血液中铅浓度高者，精子 DNA 更易变性。SCSA 也能很好的监测各种化疗药物对精子发生的影响（Spano et al，1996）。

4 检测精子的线粒体功能

线粒体的主要功能是产生能量，为精子运动提供 ATP。常用的检测线粒体功能的荧光探针有：Rhodamine 123（R123）、MITO 和 JC-1。R123 是一种能渗透入细胞，带阳离子的荧光探针，发绿色荧光。R123 可检测精子线粒体有无功能，但不能区别线粒体膜电位的高低。MITO 是一种新型线粒体探针，在水溶液中并不发荧光，而当积聚在线粒体内，不论其膜电位如何皆发绿色荧光。JC-1 在检测精子线粒体膜电位方面具有重要作用：在精子线粒体膜电位低时，以单体形式存在，发绿色荧光；当膜电位高时，形成 J-聚体，发橙色荧光。Garner et al（1997）对 3 种染料作了比较研究，发现三者都与镜检活动精子百分率高度相关。其中，JC-1 的阳性率最高，MITO 的最低；R123 和 MITO 标记的样品阳性部分只有一亚群，而 JC-1 可反映出线粒体膜电位高低的两群；JC-1 染色的特异性最好，仅在线粒体部位发黄色或绿色荧光，R123 在精子头部和尾部有非特异性染色，MITO 只在精子头部有非特异性染色。目前认为 JC-1 是检测精子线粒体功能最适合的探针。用 JC-1 对大鼠精子检测中发现在精子中段线粒体部位发黄色或绿色荧光，反映其膜电位的高低，说明 JC-1 对精子线粒体染色的特异性很好；流式检测 JC-1 的染色模式与分组精子的预期结果高度相关（Gravance et al，2001）。在牛、马的精子检测中也得到相似的结果（Garner et al，2001；Gravance et al，2000）。

线粒体特异的荧光探针经常和检测精子活力的探针同时使用。Evenson et al（1982）用 Rhodamine 123 和 EB 染色，同时检测人精子活力和线粒体功能。发现精子摄取 R123 到达平衡的速度较快，只需 10 min；R123 阳性率与精子活动性相关，反映线粒体的功能变化。Auger et al（1993）用 R123 与 PI 双重染色，流式检测结果为：死精子为 PI 阳性、R123 阴性；有线粒体功能的活精子为 PI 阴性、R123 阳性；已无线粒体功能的活精子为 PI、R123 双阴性；PI、R123 双阳性的精子不记数。Thomas et al（1998）用 JC-1 和 PI 联合使用对牛精子线粒体功能进行检测，能分辨出精子死活和线粒体功能的高低，并证明 JC-1 是检测精子经过冷冻过程后受损程度的最可靠指标。但该方法有一缺陷，JC-1 的 J-聚体发出的橙色荧光，会与 PI 的红色荧光部分重叠（Garner & Thomas，1999）。因此，还需要探索新的染色方法，更准确地检测精子的线粒体功能。

5 检测精子凋亡

尽管精子作为一种终端的不能分裂的细胞，是否存在凋亡目前尚无定论。但研究人员已经采用检测体细胞凋亡的方法来检测精子的质量。而 FCM 被认为是当今检测凋亡最敏感、最可靠的手段。常用的方法是 Annexin V/PI 双染法和末端标记法(TUNEL)。Annexin V/PI 双染法的原理是：在凋亡的早期阶段，磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜内层转移到细胞膜外层；Annexin V 为一种依赖于 Ca^{2+} 的磷脂蛋白（一般用 FITC 标记），对 PS 有高度的亲和力，可用来探测 PS 是否暴露在细胞膜外表面；结合 PI 染色，可区分坏死和凋亡。凋亡细胞为 Annexin V 阳性、PI 阴性。TUNEL 法的原理是：凋亡细胞 DNA 断裂后，其缺口 3′端可在末端脱氧核苷酸转移酶作用下结合 FITC 标记的 dUTP，或者结合 BrdU，BrdU 再与 FITC 标记的抗体孵育。凋亡细胞为 FITC 阳性。两种方法相比，Annexin V/PI 联染法样品不需固定，更方便易行。

Glander et al（1999）的结果表明，Annexin V/PI 联染法可很好的用于精子质量检测。精子冷冻后其 Annexin V 阳性率明显升高，并同精子的不同运动参数高度相关。Oosterhuis et al（2000）用 Annexin V /PI 联染法和 TUNEL 法检测了人新鲜精液的凋亡情况，发现两种方法检测到的凋亡率均为20%左右，无显著性差异；Annexin V 阴性率与精子浓度和活动率，以及 dUTP 阳性率与精子浓度，都呈高度负相关。Anzar et al（2002）用上述两种方法检测了牛新鲜精液和冻精的凋亡情况，并与繁殖率作了比较，两种方法都检测到冷冻使精子凋亡率升高，TUNEL 法检测到的鲜精凋亡率高于 Annexin V/PI 双染法。新鲜精液中凋亡精子的出现可能是其低生殖力的原因之一。Annexin V/PI 双染法检测到的鲜精活力小于 SYBR-14/PI 双染的测量值。前者能在分子水平灵敏地检测精子细胞膜的变化，因而是更准确可靠的指标。

Sun et al（1997）用 TUNEL 法检测人精子 DNA 的片断化，发现 DNA 的片断化与精子活动率、正常形态、精子浓度、体外受精率、胚胎发育率成反比；吸烟者比不吸烟者精子 DNA 的片断化比例要高。Muratori et al（2000）也报道精子 DNA 的片断化与精子前向运动率呈负相关，与精子畸形呈正相关；但电镜观察并未发现 DNA 片断化的精子出现凋亡相似的形态学变化，即出现凋亡小体。Gadella et al（2002）发现，猪精子获能后可检测到高水平的 PS，但 TUNEL 法检测无显著变化，推测精子不出现凋亡。无论如何，这两种方法都适合检测精子的质量。Annexin V/PI 双染法可检测精子质膜的稳定性，TUNEL 可检测精子 DNA 是否断裂。

6 测量精子浓度及其他

精子浓度是精液的一个基本指标。通常用血球记数仪来计数，但该方法准确性差。由于至今还未发现精子表面的特异标志，故不能像淋巴细胞那样进行流式绝对计数。Evenson et al（1993）曾经介绍过一种用 AO 或 PI 标记精子 DNA，结合已知浓度的标准荧光微球来计算牛精子浓度的方法。在此基础上，Eustache et al（2001）利用精子的散射光特性反映精子的大小和颗粒度，以及 DNA 的 PI 染色，经过两次设门，可以准确地计算人精子的浓度。该方法与血球计数仪检测相比，变异性很小。

此外，FCM 也用于检测精液中的淋巴细胞和抗精子抗体，精子脂质过氧化以及表面分子的表达，还可进行精子泛素标记免疫检测等。

7 小结与展望

精子检测的首要目标就是快速准确地确定精子的生育力。虽然常规检测方法很重要，但其在预测精子生育力方面的缺点显而易见。精子需要同时具备多种特性和功能才能受精，因而单独任何一种参数都无法完全反映其生育力。只能同时检测多个指标，才能更好地反映精子的生育力。FCM 的优点是可以快速地同时测定多个指标；只有样品中的颗粒被检测，不必洗掉游离的染料；大多数试验也不需要固定，这种方法很适合自然状态下的精子的检测。由于对精子运动性检查的变异性较大，若不直接测定精子运动参数，而用 FCM 客观地检测精子的质膜完整性、顶体状态以及线粒体膜电位的变化，即可得知精子功能的情况。精子染色质结构检测是预测精子生育力的最佳指标，这一方法在人类辅助生殖技术和家畜生殖工程中得到了重视和推广，且样品可冷冻待测，运输方便，使 SCSA 应用非常灵活。随着新的荧光探针的不断开发，染色方法的改进，试剂盒的广泛使用以及激光技术、电脑技术的迅速发展，FCM 将更加方便快捷，并可进行多种染料联合使用，进行多色分析，同时检测多

个指标，准确反映精子的功能。但FCM应用于精液质量的检测，很多还处于实验室研究阶段。试验主要在人，家畜（牛、羊、马、猪、狗、兔）及实验动物（大鼠、小鼠）中进行，在野生动物方面还未见报道。

目前，我室已成功地将FCM用于猕猴（*Macaca mulatta*）、食蟹猴（*Macaca fascicularis*）鲜精及冻精质量的检测，利用Hoechst 33342/PI/R123三色标记，可同时检测精子活力和线粒体功能；利用Hoechst 33342/PI/FITC-PNA三色标记，同时检测精子活力和顶体状态（资料待发表）。FCM要作为常规检测手段，解释须慎重，需要同荧光显微镜结合使用，与传统方法相互验证，积累更多更可靠的数据，最终确证各方法的可靠性和权威性，并使各方法标准化。

参考文献：

Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility [J]. *Biol. Reprod.*, **66** (2): 354-360.

Auger J, Leonce S, Jouannet P, Ronot X. 1993. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity [J]. *J. Histochem. Cytochem.*, **41** (8): 1247-1251.

Bochenek M, Smorag Z, Pilch J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination [J]. *Theriogenology*, **56** (4): 557-567.

Bonde JP, Joffe M, Apostoli P, Dale A, Kiss P, Spano M, Caruso F, Giwercman A, Bisanti L, Porru S, Vanhoorne M, Comhaire F, Zschiesche W. 2002. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: Lowest adverse effect levels [J]. *Occup. Envilron. Med.*, **59** (4): 234-242.

DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. 1993. Ca ($^{2+}$) -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **99** (1): 135-143.

Ericsson SA, Garner DL, Redelman D, Ahmad K. 1989. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems [J]. *Gamete. Res.*, **22** (4): 355-368.

Eustache F, Jouannet P, Auger J. 2001. Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration [J]. *J. Androl.*, **22** (4): 558-567.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility [J]. *Science*, **210** (4474): 1131-1133.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility [J]. *J. Histochem. Cytochem.*, **30** (3): 279-280.

Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT, Jost LK. 1993. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry [J]. *J. Dairy. Sci.*, **6** (1): 86-94.

Evenson DP, Jost L, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic [J]. *Hum. Reprod.*, **14**: 1039-1049.

Evenson DP, Jost L. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment [J]. *Methods Cell Sci.*, **22** (2-3): 169-189.

Fossa SD, de Angelis P, Kraggerud SM, Evenson D, Theodorsen L, Clausen OP. 1997. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay [J]. *Cytometry*, **30** (4): 192-196.

Gadella BM, Harrison RA. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells [J]. *Biol. Reprod.*, **67** (1): 340-350.

Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide [J]. *Biol. Reprod.*, **53** (2): 276-284.

Garner DL, Thomas CA. 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **53** (2): 222-229.

Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide [J]. *J. Androl.*, **15** (6): 620-629.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa [J]. *Biol. Reprod.*, **57** (6): 1401-1406.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm [J]. *Theriogenology*, **56** (1): 31-40.

Glander HJ, Schaller J. 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: A rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage [J]. *Mol. Hum. Reprod.*, **5** (2): 109-115.

Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry [J]. *Biol. Reprod.*, **43** (1): 55-64.

Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1 [J]. *Theriogenology*, **53** (9): 1691-1703.

Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. 2001. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function [J]. *Reprod. Toxicol.*, **15** (1): 5-10.

Harrison RA, Mairet B, Miller NG. 1993. Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **35** (2): 197-208.

Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. 1996. Bicarbonate/CO_2, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **45** (3): 378-391.

Huang Y, Pan TM. 1998. Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry [J]. *Reprodution & Contraception*, **18** (4): 244-245. [黄 毅，潘天明. 1998. 流式细胞仪检测人精子染色质缩合度及精液参数的关系. 生殖与避孕，**18** (4): 244-245.]

Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ, Agarwal A. 2001. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay [J]. *Fertil. Steril.*, **75** (3): 469-475.

Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. 1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure [J]. *Hum. Reprod.*, **14** (8): 2015-2019.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques [J]. *Hum. Reprod.*, **15** (8): 1717-1722.

Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **81** (1): 127-135.

Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. 2000. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm [J]. *J. Androl.*, (6): 903-912.

Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. 2000. Measuring apoptosis in human spermatozoa: A biological assay for semen quality [J]. *Fertil. Steril.*, **74** (2): 245-250.

Pasteur X, Sabido O, Maubon I, Perrin-Cottier M, Laurent JL. 1991. Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing: A flow cytometric study [J]. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **13** (6): 383-390.

Pasteur X, Metezeau P, Maubon I, Sabido O, Kiefer H. 1994. Identification of two human sperm populations using flow and image cytometry [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **38** (3): 303-309.

Pena AI, Quintela LA, Herradon PG. 1998. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry [J]. *Theriogenology*, **50** (8): 1211-1220.

Pena A, Johannisson A, Linde-Forsberg C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry [J]. *Theriogenology*, **52** (6): 965-980.

Purvis K, Rui H, Scholberg A, Hesla S, Clausen OP. 1990. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome [J]. *J. Androl.*, **11** (4): 361-366.

Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa [J]. *Biol. Reprod.*, **65** (2): 4624-4670.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure [J]. *J. Androl.*, **18** (3): 294-301.

Spano M, Bartoleschi C, Cordelli E, Leter G, Tiveron C, Pacchierotti F. 1996. Flow cytometric assessment of trophosphamide toxicity on mouse spermatogenesis [J]. *Cytometry*, **4** (2): 174-180.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro [J]. *Biol. Reprod.*, **56** (3): 602-607.

Szasz F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti AL, Gadella BM. 2000. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **55** (3): 289-298.

Tao J, Critser ES, Critser JK. 1993a. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **36** (2): 183-194.

Tao J, Du J, Critser ES, Critser JK. 1993b. Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry [J]. *Hum. Reprod.*, **8** (11): 1879-1885.

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa [J]. *Biol. Reprod.*, **56** (4): 991-998.

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry [J]. *Biol. Reprod.*, **58** (3): 786-793.

Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. 1999. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity [J]. *Fertil. Steril.*, **72** (3): 496-499.

Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. 2000. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing [J]. *Fertil. Steril.*, **74** (4): 824-827.